

Ispitivanje utjecaja organskih otapala na aktivnost halogenhidrin-dehalogenaze u reakciji otvaranja para-nitrostiren oksida

Kolić, Magdalena

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:570313>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom](#).

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-28**



FKITMCMXIX

Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Magdalena Kolić

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Magdalena Kolić

ISPITIVANJE UTJECAJA ORGANSKIH OTAPALA NA AKTIVNOST
HALOGENHIDRIN-DEHALOGENAZE U REAKCIJI OTVARANJA *para*-
NITROSTIREN OKSIDA

INVESTIGATION OF THE INFLUENCE OF ORGANIC SOLVENTS ON THE
ACTIVITY OF HALOHYDRIN DEHALOGENASE IN THE RING-OPENING
REACTION OF *para*-NITROSTYRENE OXIDE

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Zvezdana Findrik Blažević

Članovi ispitnog povjerenstva:

prof. dr. sc. Zvezdana Findrik Blažević

doc. dr. sc. Martina Sudar

prof. dr. sc. Marija Vuković Domanovac

Zagreb, rujan 2023.

Ovaj rad izrađen je na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije na Zavodu za reakcijsko inženjerstvo i katalizu pod mentorstvom prof. dr. sc. Zvezdane Findrik Blažević.

ZAHVALA

Za početak, želim se zahvaliti svojoj asistentici dr. sc. Neveni Milčić na profesionalnosti, ažurnosti, strpljivosti, korisnim savjetima i uvijek ugodnoj atmosferi pri radu u laboratoriju.

Posebno se zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Zvezdani Findrik Blažević na izvanrednom profesorskom pristupu i načinu podučavanja, zbog čega sam upravo i razvila interes i opredijelila se za ovo područje struke.

Zahvaljujem se i svojim kolegicama, Patriciji i Marini, koje su ispunile, uljepšale i olakšale studentske dane.

Na kraju, želim se ponajviše zahvaliti svojim roditeljima koji su me podržali u svim odlukama i situacijama i bez kojih ništa od ovoga ne bi bilo moguće.

Veliko Hvala svima!



SAŽETAK

Organska otapala se zbog svoje prirode i kompatibilnosti s nepolarnim organskim spojevima koriste u većini sintetskih reakcija u industrijskom mjerilu. Takvi kemijski procesi često zahtijevaju reakcije u više stupnjeva i kontaminirajuće kemijske reagense. Biotehnoška alternativa takvim kemijskim procesima uključuje enzime koji djeluju kao biokatalizatori, omogućuju korištenje sirovina na biološkoj osnovi te smanjuju broj koraka reakcije, što može biti popraćeno jeftinijom proizvodnjom. Kao rezultat ovog pristupa, dobivaju se produkti visoke kvalitete na ekonomski i tehnološki konkurentan i održiv način. Iako se biokatalitički procesi smatraju idealnim rješenjem za razvoj održivih proizvodnih sustava i unatoč ogromnom napretku u otkrivanju i razvoju enzima u području molekularne biologije, često postignuta niska produktivnost biokatalitičkog procesa, zajedno s niskom stabilnošću i aktivnosti enzima, sprječava da se njihov potencijal ostvari u industrijskim procesima.

Halogenhidrin-dehalogenaze (HHDH) su vrlo rijetki enzimi koji prirodno sudjeluju u bakterijskoj razgradnji halogenih spojeva, a zbog njihovog katalitičkog potencijala pripadaju u skupinu industrijski relevantnih biokatalizatora. U radu je korišten C-tip enzima iz skupine halogenhidrin-dehalogenaza (HheC) izoliran iz genetski modificirane bakterije *Escherichia coli*. Ispitana je aktivnost HheC enzima, u prisutnosti dvanaest različitih organskih otapala, testom pomoću *para*-nitrostiren oksida (PNSO) s bromidnim ionima u reakciji otvaranja prstena uz nastajanje *para*-nitro-2-brom-1-feniletanola (PNSHH). Aktivnost enzima određena je metodom početnih reakcijskih brzina, a koncentracije PNSHH i PNSO određene su pomoću pripremljenih baždarnih pravaca. Pripremljeni uzorci su analizirani pomoću HPLC uređaja, a utjecaj volumnih udjela organskih otapala na specifičnu aktivnost enzima prikazan je grafički. Dobivene vrijednosti $\log P$ i c_{50} organskih otapala prikazane su tablično.

Zbog toksičnosti ili zapaljivosti mnogih organskih otapala, sve više se koriste „zelene“ alternative u pogledu „zelenih“ organskih otapala. U radu su ispitana četiri „zelena“ organska otapala koja se dobivaju iz prirodnih izvora.

Ključne riječi: organska otapala, biokataliza, halogenhidrin-dehalogenaze, „zelena“ organska otapala

SUMMARY

Due to their nature and compatibility with non-polar organic compounds, organic solvents are used in most synthetic reactions on an industrial scale. Such chemical processes often require multistep reactions and contaminating chemical reagents. A biotechnological alternative to such chemical processes includes enzymes that act as biocatalysts, enable the use of biologically based raw materials and reduce the number of reaction steps which can be accompanied by cheaper production. As a result, high quality products are obtained in an economically and technologically competitive and sustainable manner. Although biocatalytic processes are considered as an ideal solution for the development of sustainable production systems and despite tremendous advances in the discovery and development of enzymes in the field of molecular biology, the often achieved low productivity of the biocatalytic process together with the low stability and activity of enzymes, prevents their potential from being realized in industrial applications processes.

Halohydrin dehalogenases (HHDH) are very rare enzymes that naturally participate in the bacterial degradation of halogenated compounds and due to their catalytic potential they belong to industrially relevant biocatalysts. This work uses a C-type enzyme from the halohydrin dehalogenase group (HheC) isolated from a genetically modified bacterium *Escherichia coli*. The activity of the HheC enzyme, in the presence of twelve different organic solvents, was tested using *para*-nitrostyrene oxide (PNSO) with bromide ions in the ring-opening reaction with the formation of *para*-nitro-2-bromo-1-phenylethanol (PNSHH). Enzyme activity was determined using the initial reaction rates method and the concentrations of PNSHH and PNSO were determined using a prepared calibration curves. The prepared samples were analyzed using an HPLC device and the influence of volume ratios of organic solvents on the specific activity of the enzyme was shown graphically. The obtained values of logP and c_{50} of organic solvents are presented in a table.

Due to the toxicity or flammability of many organic solvents, there are green alternatives in terms of green organic solvents that are increasingly being used. Four green organic solvents obtained from natural sources were tested in this paper.

Keywords: organic solvents, biocatalysis, halohydrin dehalogenases, green organic solvents

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	3
2.1. Biokatalizatori	3
2.1.1. Halogenhidrin-dehalogenaze (HHDH).....	5
2.2. Biokataliza u organskim otapalima	7
2.2.1. „Zelena“ organska otapala.....	9
2.2.2. Reakcije katalizirane halogenhidrin-dehalogenazom u organskim otapalima	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO	14
3.1. Popis kemikalija	14
3.2. Određivanje aktivnosti enzima.....	15
3.3. Aparatura.....	18
3.3.1. Reakcijski sustav	18
3.3.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)	19
3.3.3. HPLC metoda	20
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	22
4.1. Aktivnost HheC uz hidrofobna organska otapala	22
4.2. Aktivnost HheC uz „zelena“ organska otapala	27
5. ZAKLJUČAK.....	29
6. POPIS KRATICA I SIMBOLA.....	30
7. LITERATURA	33
8. PRILOZI.....	37

1. UVOD

Biokataliza je postala važan aspekt moderne organske sinteze, kako u akademskoj zajednici tako i u kemijskoj i farmaceutskoj industriji [1]. Unatoč održivosti biokatalitičkih procesa, njihov potencijal u industrijskoj proizvodnji još uvijek nije u potpunosti ostvaren. Glavni izazovi u ovom području su razvoj visoko aktivnih, robusnih i stabilnih biokatalizatora, učinkovita regeneracija kofaktora i prevencija deaktivacije biokatalizatora u nepovoljnim industrijskim uvjetima [2]. Enzimi su biokatalizatori, velike makromolekule sastavljene od polimera aminokiselina povezanih amidnim vezama, u širokom rasponu molekulskih masa. Mikroorganizmi su povoljni izvori industrijskih enzima zbog jednostavne dostupnosti i brze stope rasta, a zahvaljujući njihovoj stabilnosti, katalitičkoj aktivnosti, lakoći proizvodnje i optimizaciji od biljnih i životinjskih enzima, ostvarili su interes za upotrebu u industriji i medicini [3].

U ovom radu korišten je C-tip enzima iz skupine halogenhidrin-dehalogenaza (HheC), izoliran iz bakterija *Agrobacterium radiobacter* (AD1). Halogenhidrin-dehalogenaze (HHDH) pripadaju klasi liaza i kataliziraju reverzibilnu konverziju susjednih halohidrina i njihovih odgovarajućih epoksida. Sintetska vrijednost skupine enzima HHDH ogleda se u njihovoj sposobnosti da koriste širok raspon neprirodnih nukleofila u reakciji otvaranja epoksidnog prstena (npr. azide, cijanide, cijanate, tiocijanate, nitrite i formate), čime se omogućuje pristup novim C–C, C–S, C–N i C–O vezama [4]. Također, primjenjuju se i za sintezu optički aktivnih epoksida i β -supstituiranih alkohola, a njihova važnost proizlazi i iz toga što posjeduju visoku β -regioselektivnost i (*R*)-enantioselektivnost [7].

Jedna od glavnih prepreka korištenju enzima u industrijskoj biotehnologiji je njihova nedovoljna stabilnost u uvjetima sinteze. Reakcije s enzimima se, zbog njihove prirode, obično provode u vodi pri uvjetima sobne temperature i atmosferskog tlaka. Enzimi su u osnovi bezopasni, netoksični i biorazgradivi, pa se provođenje enzimskih reakcija uglavnom odvija bez potrebe za aktivacijom funkcionalnih skupina i koraka koji uključuju zaštitne mjere njihovog uklanjanja, što omogućuje reakcije koje su znatno ekonomičnije i stvaraju manje otpada od konvencionalnih organskih sinteza s metalnim kemijskim katalizatorima. Posljedično, biokatalitičke metode su ekološki prihvatljivije i isplativije [24]. Iako je enzimima za održavanje katalitičke aktivnosti potrebna voda, ona je i jedan od razloga nastanka velike količine neželjenog hidrolitičkog

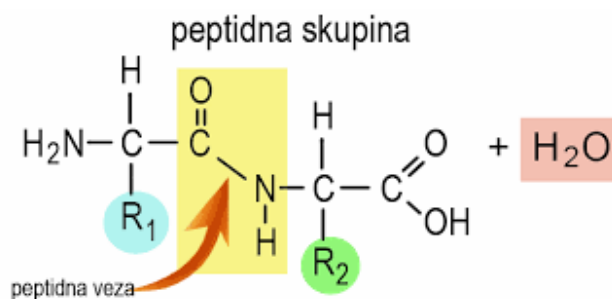
nusprodukta. Upotreba sustava organskih otapala, umjesto vodenog medija, za enzimске reakcije nudi brojne prednosti. Neke od njih su: mogućnost modifikacije enzimске regio- i enantio-selektivnosti, veće koncentracije krajnjeg željenog produkta, izbjegavanje neželjenih nusprodukata te izbjegavanje kontaminacije mikroorganizmima. Ipak, aktivnost enzima niža je kod nevodnih u odnosu na vodene medije, a na nju značajnije utječu i funkcionalne skupine, kao i molekularna struktura korištenih otapala [9].

U nastavku bit će opisan utjecaj različitih organskih otapala na aktivnost HheC enzima koji katalizira reakciju otvaranja prstena *para*-nitrostiren oksida (PNSO) s bromidnim ionima. Ispitano je ukupno dvanaest organskih otapala: etil-acetat (EtOAc), metil-*terc*-butil eter (MTBE), diizopropil eter (DIPE), kloroform, toulen, cikloheksan, *n*-heksan, *n*-heptan, te „zelena“ organska otapala: 2-metiltetrahidrofuran (2-MeTHF), ciklopentil-metil eter (CPME), dihidrolevoglukozenon (Cyrene™) i 1-oktanol. Otapala su odabrana kako bi se mogao ispitati utjecaj različitih vrsta organskih otapala prema klasifikaciji po funkcionalnim skupinama – alkani, alkoholi, eteri.

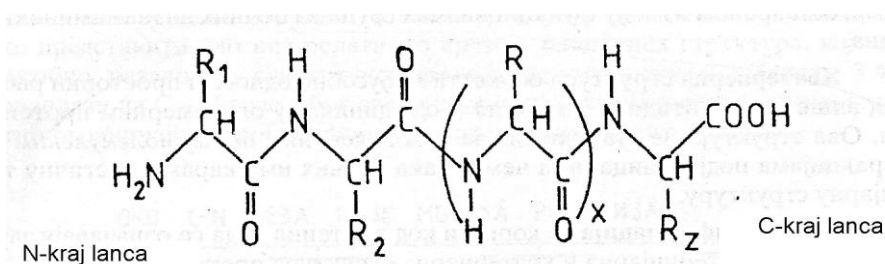
2. TEORIJSKI DIO

2.1. Biokatalizatori

Enzimi su biološki katalizatori (biokatalizatori) koji ubrzavaju biokemijske reakcije u živim organizmima, a koji se mogu ekstrahirati iz stanica i zatim koristiti za kataliziranje širokog spektra komercijalno važnih procesa. Mikroorganizmi posjeduju izvanrednu raznolikost, izgrađenu tijekom milijuna godina adaptivne evolucije. Oni čine gotovo neograničeni rezervoar enzima i bioaktivnih tvari s potencijalnom biotehnološkom primjenom [10]. Mikrobnii enzimi postali su zanimljivi zbog svoje raširene upotrebe u industriji i medicini, zahvaljujući svojoj stabilnosti, katalitičkoj aktivnosti te lakoći proizvodnje i optimizacije u odnosu na enzime dobivene iz biljnih i životinjskih stanica [3]. Enzimi su proteini koji nastaju kondenzacijom aminokiselina pri čemu nastaje peptidna veza (slika 1). S inženjerskog stajališta pokrajnji lanac je najinteresantija funkcionalna skupina jer amino- i karbonilna skupina kondenziraju međusobno tvoreći peptidne veze. Struktura proteina je organizirana u četiri strukturalna nivoa. Primarna struktura proteina je definirana lancima aminokiselina. Oni se nazivaju peptidni lanci, a prikazani su na slici 2 [11].



Slika 1. Peptidna veza [12]



Slika 2. Peptidni lanac [13]

Primjena biokatalizatora, u obliku enzima ili cijelih stanica, postala je uobičajena za proizvodnju različitih vrsta kemijskih i bioloških tvari u kemijskoj i farmaceutskoj industriji jer procesi temeljeni na enzimima obično rezultiraju smanjenjem vremena provođenja procesa, broja koraka reakcije i količine otpada. Konkretno, enzimi pružaju učinkovitiji način proizvodnje enantiomerno čistih spojeva, uglavnom kroz visoku kemoselektivnost, regioselektivnost i streoselektivnost [14]. Uz prednosti primjene enzima kao katalizatora, postoje i određeni nedostaci. Enzimi zahtijevaju optimalne uvjete temperature i pH, koji se u velikom broju slučajeva kreću oko 37 °C, odnosno pH 7,4, te i mala promjena tih uvjeta značajno utječe na njihovu aktivnost. Više temperature (iznad 40 °C) i veća odstupanja od optimalne pH vrijednosti (pH 7,4) dovode do njihove denaturacije, što ograničava uporabu enzima u uvjetima izvan organizma, odnosno stanica. Uz već navedenu denaturaciju, sklone su i inhibiciji supstratom, odnosno produktom [3]. Također, pritisak javnosti na prelazak na „zelene“ tehnologije, zbog pitanja okoliša, snažno je zahtijevao zamjenu kemijskih procesa čistim, sigurnijim i ekološki prihvatljivijim biokatalitičkim procesima. Unatoč velikom potencijalu enzima, njihova industrijska primjena je otežana, uglavnom zbog nepoželjnih svojstava u pogledu stabilnosti, katalitičke učinkovitosti i specifičnosti, te nedostatka znanja o strukturi i mehanizmima enzima. Kako bi se prevladali takvi nedostaci, pokušava se primijeniti niz pristupa, uključujući probir enzima iz prirodnih izvora, nasumične mutacije i imobilizacija [14].

Industrijska biokataliza je u skladu s većinom od 12 načela „zelene“ kemije i s ekološkog gledišta, enzimske reakcije su usklađenije s načelima „zelene“ i održive kemije u odnosu na konvencionalne kemijske procese, u pogledu atomske ekonomije, resursa i energetske učinkovitosti. To rezultira nižom potrošnjom energije, smanjenjem industrijskog onečišćenja i time ukupnom nižem ugljičnom otisku [15]. Ovo područje je doživjelo ogroman razvoj kombiniranjem novih tehnika molekularne biologije, koje se koriste za proizvodnju i dizajn enzima, u sinergiji s konceptima razvoja procesa (od šaržnih do kontinuiranih reaktora) i inženjerskim strategijama razvoja reakcijskog medija (nevodeni mediji, imobilizacija, itd.). Kao rezultat toga, biokataliza može ispuniti u mnogim slučajevima zahtjeve moderne organske sinteze i uskladiti visoku selektivnost i učinkovitost s održivošću i čvrstim ekonomskim brojkama [16].

2.1.1. Halogenhidrin-dehalogenaze (HHDH)

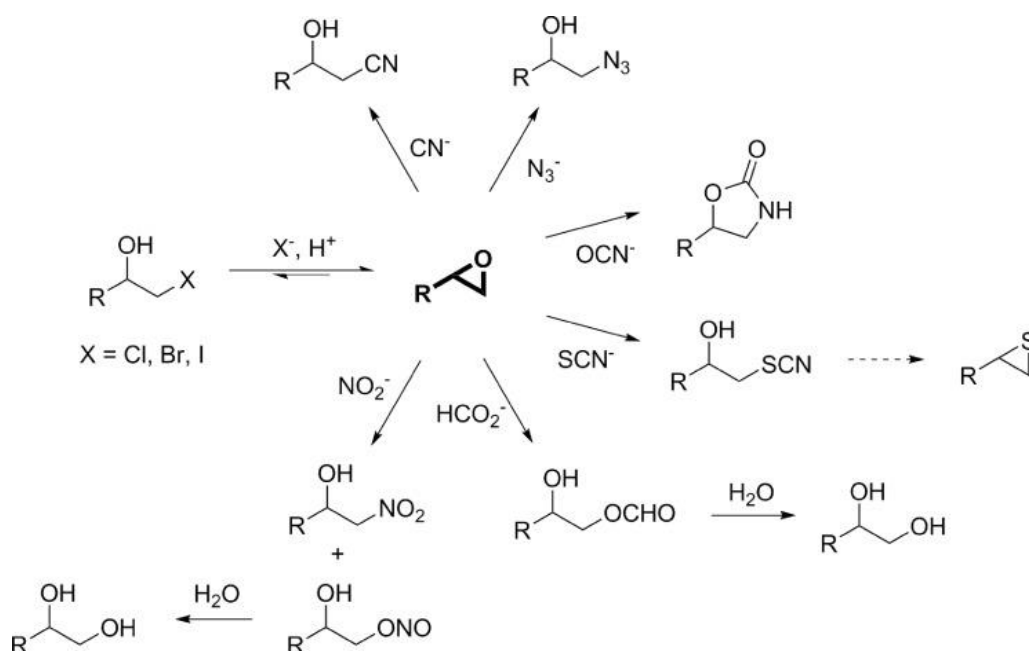
Halogenhidrin-dehalogenaze (HHDH, E.C. 4.5.1.-), također poznate i kao halogenalkohol-dehalogenaze, halogenhidrin-epoksidaze ili halogenhalid-liaze, bakterijski su enzimi koji pripadaju klasi liaza. Oni kataliziraju reakcije reverzibilne dehalogenacije halohidrina i nastajanje epoksida putem intramolekularne nukleofilne supstitucije halogena i susjedne hidroksilne skupine [7,17].

Halogeni organski spojevi predstavljaju veliku skupinu onečišćujućih tvari koje različiti mikroorganizmi mogu razgraditi i koristiti kao izvor ugljika i energije. Takvi organizmi su važni za bioremedijaciju onečišćenog tla, podzemnih i otpadnih voda. U većini slučajeva, specijalizirani enzimi nazvani dehalogenaze, kataliziraju cijepanje veza između ugljika i halogenog elementa, što predstavlja ključnu reakciju detoksikacije [18]. HHDH enzimi su izolirani ponajviše zbog svoje sposobnosti korištenja tih halogenih spojeva kao izvora ugljika i energije [21]. Budući da je reakcija dehalogenacije reverzibilna, HHDH enzimi osim što imaju sposobnost uklanjanja atoma klora, broma i joda iz onečišćivala, mogu vezati halogene ione unutar molekule [20].

Osim toga, ovi enzimi mogu prihvaćati negativno nabijene nukleofile, kao što su azidi, nitriti, cijanidi, cijanati, tiocijanati i formati, u ireverzibilnoj reakciji otvaranja epoksidnog prstena, što rezultira stvaranjem novih ugljik–ugljik, ugljik–dušik ili ugljik–kisik veza (slika 3). Ove reakcije omogućavaju biokatalitičku sintezu optički aktivnih epoksida i β -supstituiranih alkohola, uključujući kiralne tercijarne alkohole. Pored njihovog izvanrednog prihvaćanja nukleofila, ne zahtijevaju kofaktore i pokazuju visoku regio- i enantioselektivnost, što ih čini pogodnima za praktičnu primjenu u biokatalizi [7,17,20].

Unatoč značajnom potencijalu halogenhidrin-dehalogenaza kao biokatalizatora, samo nekoliko ih je do sada postalo dostupno znanstvenoj i industrijskoj zajednici. Od početnog otkrića bakterijskih enzima s HHDH aktivnostima, vrlo mali je broj HHDH enzima pročišćen i biokemijski okarakteriziran [19]. Iz tog razloga je donedavno objavljeno samo pet različitih HHDH sekvenci koje su pridružene jednom od tri različita filogenetska podtipa A, B i C: sekvenca HheA i HheB gena iz bakterije *Corynebacterium* sp. (N-1074), sekvenca HheA2 gena iz bakterije *Arthrobacter* sp. (AD2), sekvenca HheB2 gena iz bakterije *Mycobacterium* sp. (GP1) te dvije jednake sekvence HheC gena iz bakterija *Agrobacterium radiobacter* (AD1) i *Rhizobium* sp.

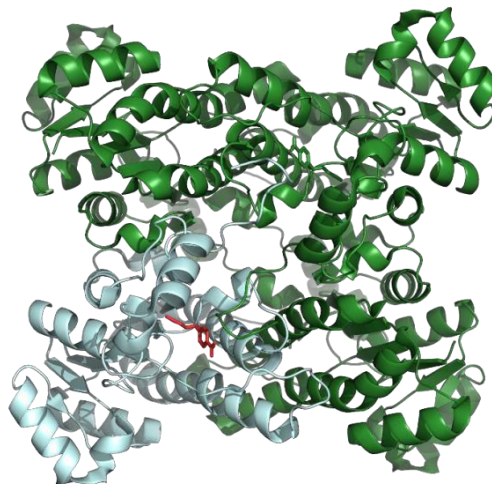
(NHG3). Od ovih enzima, najviše je proučavan enzim HheC koji pokazuje visoku enantioselektivnost prema širokom rasponu supstrata i nukleofila koje prihvaća u reakcijama otvaranja prstena [17]. Kao rezultat novijih istraživanja, prethodna klasifikacija HHDH enzima proširena je s četiri nova podtipa (D–G) na temelju njihovog filogenetskog odnosa i u skladu sa sličnostima u genetskim sekvencama i bioaktivnosti. Najzanimljiviji među njima pokazuje se HheG iz *Ilumatobacter coccineus*. Ovaj enzim pokazuje, suprotno svim drugim HHDH enzimima, visoku regioselektivnost na α -položaju u reakcijama otvaranja epoksidnog prstena i može se koristiti u reakcijama otvaranja prstena sterički zahtjevnih cikličkih epoksida [7].



Slika 3. Katalitičko djelovanje halogenhidrin-dehalogenaza [17]

Proučavanjem kristalizacije halogenhidrin-dehalogenaza, otkriveno je da su svi poznati HHDH enzimi homotetrameri u svom aktivnom obliku, tj. dimeri dimera sastavljeni od identičnih podjedinica od približno 28 kDa (slika 4). Studije su dokazale sličnosti između HHDH enzima s kratkolančanim dehidrogenazama/reduktazama (SDR), pri čemu je jedna od glavnih razlika kofaktorska neovisnost HHDH. Umjesto kofaktorskog veznog mjesta, HHDH posjeduju prostran nukleofilni džep koji prihvaća monovalentne nukleofile linearne geometrije [20].

Svi poznati HHDH enzimi posjeduju katalitičku trijadu Ser-Tyr-Arg, odgovornu za reverzibilnu reakciju dehalogenacije koja se odvija prema S_N2 -nukleofilnom mehanizmu [20].



Slika 4. Tercijarna struktura enzima HheC iz *Agrobacterium radiobacter* (AD1) u kompleksu s (*R*)-1-*para*-nitro-fenil-2-azido-etanolom na Ser132/Tyr145/Arg149 katalitičkoj trijadi. Slika preuzeta iz [20]

2.2. Biokataliza u organskim otapalima

Enzimi u prirodnom okruženju, unutar živih organizama, kataliziraju reakcije u vodenim otapalima. Za održavanje enzimske aktivnosti obično je potrebna vrlo mala koncentracija vode, međutim, vodena otapala nisu uvijek najbolja u organskoj sintezi [22]. Korištenje organskih otapala je strategija koja se najčešće koristi za povećanje topljivosti hidrofobnih spojeva [23]. Napredak korištenja enzima u nevodenim otapalima ili u mješavinama vodenog otapala i organskih otapala koja su mješljiva s vodom, ogleda se kroz poboljšanu brzinu otapanja hidrofobnih supstrata i time otkriće enzimskih reakcija u organskim otapalima koje nisu izvedive u vodenim otapalima [22].

Djelovanje biokatalizatora značajno ovisi o sustavu otapala. Najbolji medij trebao bi osigurati optimalne brzine reakcije i pojednostaviti postupak izolacije produkta, kako bi proces bio što ekonomičniji i ekološki prihvatljiviji. Enzimska reakcija u organskom otapalu opisana je već 1970.-ih, a trenutno su za biokatalizu dostupne četiri vrste otapala: vodena, organska otapala, ionske kapljevine i superkritični fluidi. Također, vrlo često se za biokatalizu koriste dvofazni ili trofazni sustavi otapala koji se sastoje od dvije ili više vrsta otapala [22].

U usporedbi s konvencionalnom biokatalizom u vodenim medijima, biokataliza u nevodnim medijima pruža razne pogodnosti. Primjer su: mogućnost provođenja kataliza širokog spektra kemijskih reakcija koje nisu izvedive u vodenom mediju zbog nepovoljne termodinamičke ravnoteže u vodi, jednostavno odvajanje biokatalizatora i produkata reakcije, povećana topljivost hidrofobnih supstrata, izbjegavanje neželjenih hidrolitičkih produkata, poboljšana kemo-, regio- i stereoselektivnost, ponovno korištenje enzima, povećana termostabilnost biokatalizatora te sprječavanje kontaminacije mikroorganizmima [22].

Istraživanja su dokazala kako logP organskih otapala utječe na aktivnost enzima, a osim logP, funkcionalne skupine i molekularna struktura organskih otapala također imaju značajan utjecaj na aktivnost enzima. Međutim, u većini slučajeva, aktivnost enzima u nevodnom mediju niža je nego u vodi (do nekoliko redova veličine). Smatra se kako su različiti čimbenici odgovorni za nižu katalitičku aktivnost enzima u nevodnom mediju, kao na primjer ograničenje difuzije, visoka koncentracija zasićenog supstrata, ograničena fleksibilnost proteina, konformacijske promjene, niska stabilizacija intermedijera enzim-supstrat i neoptimalna hidratacija biokatalizatora [9].

Povećano razumijevanje molekularnih promjena u enzimskoj strukturi i katalitičkom mehanizmu u nekonvencionalnim reakcijskim medijima, dovelo je do razvoja mnogih komplementarnih metoda, uključujući dodavanja jednostavnih stabilizirajućih sredstava do visoko sofisticiranih pristupa proteinskog inženjerstva, kako bi se povećala stabilnost enzima prema organskim otapalima [8]. Glavni čimbenik koji se mora uzeti u obzir pri izvođenju biokatalize u nekonvencionalnim medijima je sadržaj vode. Lipaze, proteaze i mnogi drugi enzimi učinkovito djeluju u čistim organskim otapalima. Međutim, čak i u tim slučajevima, barem nekoliko molekula vode ostaje vezano za molekulu proteina. Općenito se vjeruje da su potpuno dehidrirani proteini neaktivni. Voda koja djeluje kao lubrikant potiče konformacijsku pokretljivost potrebnu za

optimalnu katalizu, dok čista organska otapala dovode do jačih intramolekularnih interakcija. S druge strane, ako sadržaj vode u organskom otapalu prijeđe određenu granicu, tendencija denaturacije enzima je povećana zbog veće konformacijske pokretljivosti. Ovo opažanje objašnjava zašto povećanje koncentracije organskog ko-otapala koje je mješljivo s vodom u vodenom mediju općenito smanjuje aktivnost enzima. Većina enzima postaje gotovo potpuno neaktivna pri koncentraciji organskog ko-otapala od 60 – 70 % (v/v) [8]. Konformacijske promjene najčešći su razlog deaktivacije enzima u prisutnosti organskih otapala. Konkretno, hidrofilna otapala, za koja je poznato da prodiru u aktivna mjesta enzima, sposobna su izazvati sekundarne i tercijarne strukturne promjene. Štoviše, u usporedbi s hidrofobnim otapalima, hidrofilna otapala pokazuju veću tendenciju uklanjanja vode vezane za proteine, koja je ključna za održavanje strukture i katalitičke funkcije proteina. S obzirom na strukturni integritet, svojstva enzima obično su očuvana u većoj mjeri u prisutnosti hidrofobnih organskih otapala u odnosu na hidrofilna [8,20].

Organska otapala su najčešće korištena nevodena otapala za biokatalizu. Na primjer, otapala koja su nemješljiva s vodom kao što su heksan, etil-acetat i izopropil eter, te otapala koja su mješljiva s vodom kao što su dimetil sulfoksid (DMSO) i 2-propanol, često su korištena u primjeni. Koncentracija organskih otapala mora se podesiti kako bi se optimizirala reakcija za otapanje supstrata, ali bez inhibicije enzima [22].

2.2.1. „Zelena“ organska otapala

Zelena kemija je koncept koji je formulirao Paul Anastas, a usmjeren je na smanjenje negativnog utjecaja proizvodnje i supstrata korištenih u kemijskim procesima. Zelena kemija nije zasebna cjelina, već se odnosi na cijelu kemiju, pa se kemičari iz svih područja trude približiti održivoj kemiji. Dvanaest načela zelene kemije smjernice su za stvaranje ekološki prihvatljivije kemije. Peto načelo izravno se odnosi na primjenu otapala i navodi da: „Upotrebu pomoćnih tvari (tj. otapala) kad god je moguće treba izbjegavati, a kada se koriste, potrebno je da budu bezopasna" [25]. Ako „zeleno“ otapalo može značajno smanjiti ukupni potrebni reakcijski volumen, primjena ovih otapala može rezultirati ekološki prihvatljivijim sustavima u usporedbi sa sustavima koji se primjenjuju u vodenim medijima. „Zeleno“ otapalo ima životni ciklus s malim utjecajem na okoliš.

To podrazumijeva sljedeće:

- Može se proizvesti na ekološki prihvatljiv način, idealno iz obnovljivih izvora.
- Trebalo bi se lako ponovno upotrijebiti ili reciklirati.
- Prilikom ispuštanja mora imati minimalan utjecaj na okoliš [31].

Toksičnost i/ili zapaljivost mnogih organskih otapala, posebice stvaranje eksplozivnih smjesa s kisikom u plinovitoj fazi, ozbiljan je nedostatak u usporedbi s vodenim reakcijama. Jedan pristup rješavanju ovog problema je korištenje aprotinskih otapala koja se miješaju s vodom, kao što su dimetil formamid (DMF) i dimetil sulfoksid (DMSO) [26]. DMSO je pri povišenim temperaturama manje stabilan, dok je acetonitril stabilnije aprotinsko otapalo pri istim uvjetima [27]. Međutim, mnoga od tih otapala rijetko se koriste zbog zdravstvenih i ekoloških pitanja [26].

Nedavno su u vodiče za odabir otapala uvrštena nova otapala, uglavnom eteri, esteri i alkoholi, koji još uvijek nisu u potpunosti okarakterizirani „zelenima“, ali se smatraju „zelenijim“ otapalima [25]. Alkoholi i esteri su „zeleniji“ od strukturno sličnih otapala iz drugih grupa, a mnogi ugljikovodici, klorirani ugljikovodici i eteri, klasificirani su kao opasni ili vrlo opasni na temelju njihove toksičnosti i/ili zapaljivosti [27]. U novije vrijeme, koriste se organska otapala od kojih su mnoga biološkog porijekla. Eteri koji imaju manju topljivost u vodi i manje opasna svojstva od klasičnih etera, uključuju etil-*terc*-butil eter (ETBE), ciklopentil-metil eter (CPME), *terc*-amil-metil eter (TAME), dimetil izosorbid i 2-metiltetrahidrofuran (2-MeTHF). 2-MeTHF je nedavno postigao popularnost otapala za organsku sintezu. Esteri koji su postali popularna otapala, a koji su biološkog porijekla, uključuju etil-laktat, izobutil-acetat, dietil-sukcinat i γ -valerolakton (GVL) te dimetil- i dietil- karbonate. Etilen, propilen i butilen karbonati su polarniji ciklički karbonati koji omogućavaju zamjenu za toksična aprotinska polarna otapala, kao što su DMF i 1-metil-2-pirolidon (NMP). U ovu skupinu polarnih cikličkih karbonata pripada i Cyrene (dihidroleovoglukozenon) koji se dobiva pirolizom i hidrolizom celuloze, i u potpunosti je biorazgradiv [20,27]. Među organskim otapalima, etanol se također smatra „zelenim“ otapalom i može se proizvesti iz lignocelulozne biomase ili procesom fermentacije [20,28].

Etil-laktat (EL) je ekološki prihvatljivo otapalo koje se dobiva iz biomase, s visokom toplinskom stabilnošću i visokom mješljivošću s vodom. Otapa se u polarnim i nepolarnim medijima [29]. Prethodno spomenuti 2-MeTHF i CPME, dobivaju se hidrogenacijom furfurala i levulinske kiseline, koje se dobivaju iz šećerne trske i klipa kukuruza. Ova otapala su manje opasna

za zdravlje ljudi i životinja, te stvaraju manje problema u pogledu odlaganja. 2-MeTHF fotokemijski se razgrađuje u reakcijama oksidacije i otvaranja prstena, pri normalnim uvjetima. Fizikalno-kemijska svojstva slična su onima kod toluena i može se koristiti kao ekološki prihvatljivija alternativa uobičajenim aprotionskim otapalima. Ima nekoliko prednosti, kao što su nemiješanje s vodom, niska hlapljivost, stabilnost u kiselinama i bazama, niska zapaljivost i najmanji ugljični otisak od svih uobičajeno korištenih otapala. γ -Valerolakton (GVL) je „zeleno“ otapalo koje se dobiva iz biomase na bazi lignoceluloze. Ima fizikalna svojstva slična DMF, dimetil acetamidu (DMA), NMP i acetonitrilu te se može koristiti kao „zelenija“ alternativa za polarna aprotionska otapala. Iako se koriste u praksi, dobivanje „zelenih“ otapala zahtijeva komplicirane sintetske postupke uz visoke troškove [29]. Također, hidrofobna „zeleni“ otapala su još uvijek rijetka, i uz trenutnu ponudu, često je nemoguće pronaći alternative tradicionalnim otapalima dobivenim iz naftnih izvora [20].

2.2.2. Reakcije katalizirane halogenhidrin-dehalogenazom u organskim otapalima

Reakcije katalizirane halogenhidrin-dehalogenazom proučavane su od kasnih 1960.-ih, međutim, broj i raznolikost poznatih enzima još uvijek je ograničen [30]. U prirodi su enzimi evoluirali kako bi optimalno funkcionirali u vodenom okruženju, zbog toga se vodeni puferi često koriste kao reakcijski medij kada se enzimi primjenjuju u kemijskoj sintezi. Međutim, u industrijskim razmjerima gdje enzimi kataliziraju reakcije s neprirodnim supstratima, uporaba vodenog medija može predstavljati prepreku zbog slabe topljivosti mnogih industrijski relevantnih spojeva u vodi [31].

Kako bi se povećala topljivost hidrofobnih supstrata u vodenoj fazi, najčešći pristup je dodavanje ko-otapala kao što su DMSO, etanol ili aceton. Iako, sposobnost otapanja ko-otapala je ograničena. Štoviše, prekomjerna koncentracija ko-otapala može uzrokovati denaturaciju enzima. Dodavanjem druge faze, u većini slučajeva organske faze, omogućava se formiranje dvofaznog sustava i alternativni je pristup rješavanju ovog problema. Ova metoda može istovremeno povećati koncentraciju supstrata i pojednostaviti proces ekstrakcije produkta. Dodavanje druge faze može spriječiti inhibiciju produktom ili supstratom [35].

Laboratorijska ispitivanja reakcija kataliziranih s HHDH enzimima uglavnom se izvode u vodenom mediju uz dodatak dimetil sulfoksida (DMSO) u koncentracijama 2 – 5 % (v/v), dok u određenim istraživanjima ovaj broj ide do najviše 10 % [20]. DMSO (C₂H₆OS) je mala amfipatska organska molekula s hidrofilnom sulfoksidnom skupinom i dvije hidrofobne metilne skupine. DMSO je aprotonsko otapalo i u reakcijama teži prihvaćanju, a ne doniranju protona. Može se koristiti kao otapalo za širok spektar organskih i anorganskih spojeva u visokim koncentracijama. Osim toga, ima nisku toksičnost, zbog čega se često koristi kao univerzalno otapalo u znanstvenim istraživanjima, za testiranje lijekova i u biomedicinskim primjenama [32].

Osim reakcija s DMSO, postoje ispitivanja i s drugim vrstama organskih otapala. U jednom radu, korištena su organska otapala s ciljem smanjenja racemizacije supstrata, čime se povećava prinos produkta. Ispitan je utjecaj različitih vrsta organskih otapala s hidrofilnim ili hidrofobnim svojstvima na optičku čistoću izraženu enantiomernim suviškom (engl. *enantiomeric excess*, *ee*) i prinos (*R*)-epiklorhidrina, koji je dobiven iz 1,3-dikloro-2-propanola, dvofaznom biokatalizom pomoću imobiliziranih *Escherichia coli* stanica koje sadrže HheC i EH (epoksidne hidrolaze). Rezultati su pokazali da se u hidrofobnim otapalima, tj. *n*-heksanu, cikloheksanu, *n*-heptanu i izooktanu, prinos produkta značajno povećao i *ee* produkta održao za ≥ 99 % u odnosu na reakciju u puferu. Nasuprot tomu, zabilježena je vrlo niska aktivnost imobiliziranih stanica u reakcijskom sustavu s diklormetanom i acetonom, zbog njihove toksičnosti na enzime, što je rezultiralo vrlo niskim *ee* i prinosom (*R*)-epiklorhidrina. Cikloheksan je odabran kao optimalno organsko otapalo uz povećanje prinosa produkta s 19,2 % u puferu do 25,1 % korištenjem dvofaznog sustava koji sadrži 40 % cikloheksana [20,33].

Drugi primjer objašnjava kako poboljšati produktivnost asimetrične sinteze (*S*)-2,3-dikloro-1-propanola, katalizirane cijelim stanicama rekombinantne *E. coli* koje predstavljaju aktivnost HHDH, zbog inhibicije produktom. U ovom radu testirano je šest organskih otapala, uključujući toluen, cikloheksan, diklormetan, *n*-heksan, *n*-heptan i izooktan. Na temelju rezultata, *n*-heptan je odabran kao najbolje organsko otapalo za ovaj dvofazni sustav, tj. primjena dvofaznog sustava *n*-heptan–voda mogla bi smanjiti koncentraciju toksičnog produkta u vodenoj fazi i minimizirati inhibiciju produktom. Također, utvrđeno je da su omjer volumena faza, pH pufera i reakcijska temperatura ključni, budući da značajno utječu na prinos i enantioselektivnost u organsko–

vodenom dvofaznom sustavu. Dvofazni sustav koji sadrži volumni omjer *n*-heptana i pufera 1:4, rezultirao je 2,5 puta većom produktivnošću biokatalizatora [20,34].

U idućem primjeru, opisano je dobivanje kiralnih β -hidroksi nitrila u reakciji kataliziranoj alkohol-dehidrogenazom (AdhS) i halogenhidrin-dehalogenazom (HHDH), kao primjer modela bioelektrosinteze, budući da su oni visokovrijedni intermedijeri u sintezi statina. Kako bi se povećala koncentracija supstrata, izbjegla spontana reakcija hidrolize supstrata i produžio životni vijek elektrode, ispitana su četiri organska otapala, uključujući heksan, metil-*tert*-butil eter (MTBE), etil-acetat i diklormetan. Dobiveno je kako dodatak organske faze ima očiti učinak na aktivnost AdhS i HHDH. U usporedbi s jednofaznim reakcijskim sustavom pufera, dodavanje 30 % heksana, etil-acetata i diklormetana smanjilo je aktivnost AdhS i HHDH, dok se dodatkom 30 % MTBE aktivnost enzima blago povećala. Više od 96 % krajnjeg produkta ekstrahirano je u MTBE, te je korišten kao organska faza u dvofaznom sustavu bioelektrokatalize [20,35].

U navedenim primjerima opisan je utjecaj nekih organskih otapala na reakcije katalizirane s HHDH. Može se zaključiti kako hidrofobna organska otapala općenito pokazuju pozitivniji učinak na aktivnost enzima u odnosu na hidrofilna otapala. Ostali faktori poput pH, temperature, omjera organske i vodene faze te oblik korištenog enzima (u obliku cijelih stanica ili imobiliziran), također značajno utječu na svojstva enzima. Stručnjaci se slažu da na aktivnost, stabilnost, enantioselektivnost i ukupnu produktivnost enzima utječu kemijska i fizikalno-kemijska svojstva otapala, priroda enzima i vrsta katalizirane reakcije. Međutim, mehanizam djelovanja organskih otapala na svojstva HHDH enzima još uvijek je nepoznat [20].

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Popis kemikalija

Kemikalije korištene u eksperimentalnom dijelu rada navedene su u tablici 1. Uz komercijalno dostupne kemikalije naveden je proizvođač. Uz komercijalno nedostupne kemikalije naveden je literaturni izvor protokola, ako je već sintetizirana kemikalija preuzeta u Zavodu za organsku kemiju Instituta „Ruđer Bošković“ (IRB).

Tablica 1. Korištene kemikalije

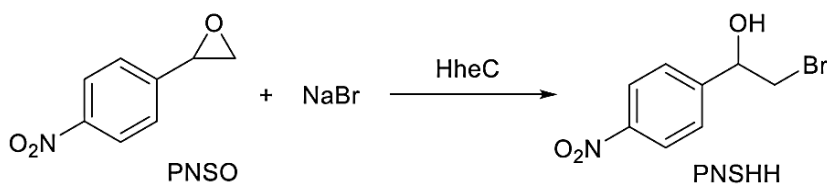
Puni naziv kemikalije	Kratice ili kemijski simbol	Proizvođač ili literaturni izvor protokola za sintezu
2-Amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propandiol sulfatni pufer	TriS-SO ₄	Acros Organics, Belgija
β-Merkaptoetanol	/	Honeywell Fluka, SAD
Coomassie brilliant blue G-250	CBB	Honeywell Fluka, SAD
Natrijev hidroksid	NaOH	Gram-mol d.o.o., Hrvatska
Etilendiamintetraoctena kiselina	EDTA	Carl Roth, Njemačka
Albumin goveđeg seruma	BSA	Sigma-Aldrich, SAD
Fosforna kiselina	H ₃ PO ₄	Sigma-Aldrich, SAD
Etanol	EtOH	Scharlau, Španjolska
Cikloheksan	C ₆ H ₁₂	Scharlau, Španjolska
<i>n</i> -Heksan	C ₆ H ₁₄	Scharlau, Španjolska
<i>n</i> -Heptan	C ₇ H ₁₆	Scharlau, Španjolska
Etil-acetat	EtOAc	VWR International, SAD
Metil- <i>terc</i> -butil eter	MTBE	VWR International, SAD
Diizopropil eter	DIPE	VWR International, SAD
Kloroform	CHCl ₃	VWR International, SAD
Toulen	C ₇ H ₈	VWR International, SAD
2-Metiltetrahidrofuran	2-MeTHF	Sigma-Aldrich, SAD
Ciklopentil-metil eter	CPME	Sigma-Aldrich, SAD

Dihidrolevoglukozenon	Cyrene™	Sigma-Aldrich, SAD
1-Oktanol	C ₈ H ₁₈ O	Sigma-Aldrich, SAD
Acetonitril	ACN	Sigma-Aldrich, SAD
Natrijev bromid	NaBr	Sigma-Aldrich, SAD
<i>para</i> -nitro-2-brom-1-feniletanol	PNSHH	Lutje Spelberg et al. 2002
<i>para</i> -nitrostiren oksid	PNSO	Lutje Spelberg et al. 2002
C tip halogenhidrin-dehalogenaze	HheC	Schallmeyer et al. 2008

Uzgoj bakterijskih stanica *E. coli* s prekomjernom ekspresijom enzima napravljen je na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zavodu za reakcijsko inženjerstvo i katalizu. Nakon uzgoja provedena je izolacija i pročišćavanje halogenhidrin-dehalogenaze iz stanica genetski modificirane *E. coli*. Sirovi enzimski ekstrakt HheC skladišten je u zamrzivaču pri temperaturi – 20 °C i odmrzavan neposredno prije korištenja.

3.2. Određivanje aktivnosti enzima

Aktivnost enzima određivana je u skladu s utvrđenim protokolom opisanom u literaturi (Lutje Spelberg i sur. 2002; Milčić i sur. 2022) uz prilagodbe navedene u nastavku. Određivanje aktivnosti HheC enzima provedeno je testom pomoću *para*-nitrostiren oksida (PNSO) s bromidnim ionima, u reakciji otvaranja epoksidnog prstena, izvedenoj s organskim otapalima uz nastajanje *para*-nitro-2-brom-1-feniletanola (PNSHH) kako je prikazano na slici 5.



Slika 5. Reakcija otvaranja prstena *para*-nitrostiren oksida (PNSO) u *para*-nitro-2-brom-1-feniletanol (PNSHH) katalizirana HheC enzimom. Slika preuzeta iz [36]

Aktivnost enzima pratila se unutar Eppendorf epruveta ukupnog volumena 2 mL, pri čemu je volumen reakcijske smjese bio 500 μL . Epruvete su imale navojni čep kako bi se spriječilo isparavanje otapala, a reakcije su provedene na tresilici ThermoMixer C (Eppendorf, Njemačka) pri 1000 okr min^{-1} i 25 $^{\circ}\text{C}$. U epruveti, koja služi kao reaktor, pripremljene su 10 mM otopina NaBr (dodavanjem 10 μL iz 500 mM temeljne otopine), 7,5 mM otopina PNSO (dodavanjem 7,5 μL iz 500 mM temeljne otopine), odabrani volumeni organskih otapala (1 – 50 % (v/v)), 1 mg/mL slobodnog enzima HheC (dodavanjem 100 μL iz temeljne otopine 5 mg/mL). Do ukupnog volumena reakcijske smjese od 500 μL , dodan je 500 mM Tris- SO_4 pufer. Reakcija započinje dodatkom enzima, nakon čega se reakcijska smjesa homogenizira i uzimaju se alikvoti od 10 μL uzorka iz reaktora, dodaje se 490 μL acetonitrila (ACN) za zaustavljanje reakcije, homogenizira se i odmah filtrira kroz 0,22 μm filtar (Chromafil Xtra H-PTFE (Macherey-Nagel, Njemačka)) u vialu za HPLC, kako bi se enzim odvojio od ostatka uzorka. Isti postupak ponavlja se pet puta za svaku reakciju različitih volumnih koncentracija organskog otapala, unutar 10 % konverzije supstrata, budući da se aktivnost enzima određuje metodom početnih reakcijskih brzina. Uzorci su analizirani pomoću HPLC uređaja, a koncentracije PNSHH i PNSO određene su pomoću prethodno pripremljenog baždarnog pravca (prilog 1). Baždarni pravci pripremaju se razrjeđivanjem temeljne otopine PNSO i PNSHH u puferu, i obradom uzoraka na isti način (razrjeđivanje u ACN, filtracija). Specifična aktivnost enzima (*S.A.*) izračunata je preko stvaranja produkta tijekom vremena kada je konverzija supstrata manja od 10 % (jednadžba 1), pri čemu V_R označava volumen reaktora, V_E volumen dodanog enzima, dc/dt promjenu koncentracije produkta tijekom vremena, a γ_E koncentraciju enzima u osnovnoj otopini [36].

$$S.A. = \frac{V_R}{V_E} \cdot \frac{dc}{dt} \cdot \frac{1}{\gamma_E} \quad (1)$$

Organska otapala korištena u ovom radu, čiji se utjecaj ispitivao na aktivnosti HheC enzima prikazana su u tablici 2.

Tablica 2. Svojstva i klasifikacija organskih otapala ispitana u HDDH biokatalizi. Tablica prilagođena i preuzeta iz [20]

Otapalo	Vrijednost logP	Miješanje s vodom	Klasifikacija prema funkcionalnoj skupini	Kemijska struktura
Cyrene	-1,52	Mješljivo	Alkan (ciklički)	
EtOAc	0,73	Djelomično mješljivo	Ester	
MTBE	0,94		Eter	
DIPE	1,52		Eter	
kloroform	1,97		Kaloalkan	
toulen	2,73		Aren	
CPME	1,6		Eter	
cikloheksan	3,44	Nemješljivo	Alkan (ciklički)	
<i>n</i> -heksan	3,9		Alkan	
<i>n</i> -heptan	4,66		Alkan	
2-MeTHF	1,1		Eter	
1-oktanol	3,5		Alkohol	

3.3. Aparatura

3.3.1. Reakcijski sustav

Reakcije su provedene u sustavu prikazanom na slici 6. Reakcijski sustav sastojao se od Eppendorf epruvete, tresilice ThermoMixer C (Eppendorf, Njemačka) koja služi za termostatiranje i miješanje reakcijske smjese, miješalice Vortex-Genie (Scientific industries, Inc., SAD) za postizanje homogenih uvjeta unutar reaktora prije uzorkovanja, automatske pipete i šprice za uzorkovanje reakcijske smjese. Za odvajanje enzima od ostatka uzorka korišten je 0,22 μm filtar (Chromafil Xtra H-PTFE (Macherey-Nagel, Njemačka)). Uzorci se direktno filtriraju u viala za HPLC analizu opisanu u nastavku u poglavlju 3.3.3.



Slika 6. Reakcijski sustav

3.3.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

Kromatografija je fizikalna metoda separacije smjesa koja se temelji na različitom razdvajanju komponenata uzorka između dvije faze: pokretne (mobilne) i nepokretne (stacionarne). Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) je analitička tehnika koja se koristi za odvajanje, identifikaciju ili kvantificiranje svake komponente u smjesi. Smjesa se odvaja pomoću osnovnog principa kromatografije na stupcu (u koloni), a zatim se identificira i kvantificira spektroskopijom. U 1960.-ima, tekućinska kromatografija (engl. *Liquid Chromatography*, LC) na stupcu s niskotlačnim odgovarajućim staklenim stupcima, razvijena je u HPLC s visokotlačnim prilagođenim metalnim stupcima. Za razliku od LC gdje otapalo kapa kroz kolonu uslijed djelovanja gravitacijske sile, kod HPLC pumpa dovodi otapalo pod visokim tlakom i konstantnom brzinom kroz sustav. HPLC je stoga poboljšan oblik tekućinske kromatografije na stupcu [37].

Princip odvajanja HPLC kromatografije temelji se na raspodjeli analita (uzorka) između mobilne faze (otapalo) i stacionarne faze (materijal za pakiranje kolone). Ovisno o kemijskoj strukturi analita, molekule se usporavaju dok prolaze kroz stacionarnu fazu. Specifične međumolekulske interakcije između molekula uzorka i materijala za pakiranje određuju njihovo vrijeme zadržavanja (engl. *retention time*) u koloni [38]. Mobilna faza služi kao otapalo i prenosi uzorak kroz kolonu. Zbog interakcija s mobilnom i stacionarnom fazom, dolazi do razdvajanja uzoraka. Spojevi koji su dobro topljivi u mobilnoj fazi, a imaju mali afinitet prema stacionarnoj fazi, brže se ispiru iz kolone, dok spojevi koji su dobro topljivi u stacionarnoj fazi, a slabo topljivi u mobilnoj fazi, puno sporije prolaze kroz kolonu. Prolaskom mobilne faze kroz kolonu, narušava se ravnoteža, te se nova ravnoteža uspostavlja između sastojaka koji se razdjeljuju među fazama. Sastojci unutar uzorka posjeduju i različite ravnotežne podjele između faza, pri čemu svaki sastojak ostvaruje različito vrijeme zadržavanja, koje se definira kao vrijeme koje razdvojeni sastojak provede u kromatografskom sustavu i specifično je za pojedine komponente [39]. Time se postiže odvajanje sastojaka uzorka. Jedinica za detekciju (npr. UV detektor) prepoznaje analite nakon napuštanja kolone. Signali se pretvaraju i bilježe pomoću sustava za upravljanje podacima (računalni softver), a zatim se prikazuju u obliku kromatograma. Općenito, HPLC sustav sadrži sljedeće dijelove: spremnik otapala, pumpu, injekcijski ventil, kolonu, detektor, jedinicu za obradu podataka te spremnik za otpad [38].

Prednosti HPLC u usporedbi s ostalim kromatografskim tehnikama su: relativno visok radni tlak (do 400 bara), mali promjer čestica punila, mali promjer kolone, osjetljivi detektori za detekciju male količine analita, visoki stupanj separacije, brza analiza [39].

3.3.3. HPLC metoda

U ovom radu određivanje koncentracija PNSHH i PNSO, te aktivnosti enzima provedeno je pomoću uređaja LC-40 Nexera Lite (Shimadzu, Japan) s detektorom s nizom fotometrijskih dioda (engl. *photodiode array*, PDA) pri 275 nm i 30 °C, prikazanom na slici 7.



Slika 7. HPLC uređaj (LC-40 Nexera Lite (Shimadzu, Japan))

Mobilna faza A sastojala se od 80 % ACN, 20 % ultračiste vode i 0,1 % trifluoroctene kiseline (TFA), dok se mobilna faza B sastojala od 100 % ultračiste vode koja sadrži 0,1 % TFA. Mobilne faze A i B korištene su sa stacionarnom fazom koja je bila kolona Kinetex Core-shell C18 (2,6 μ m, 100 \times 4,6 mm) (Phenomenex, SAD), pri brzini protoka od 1,5 mL/min. Korišteno je gradijentno ispiranje od 40 do 30 % faze B tijekom 5 minuta, s povratkom na početnih 30 % tijekom sljedeće 2 minute. Vrijeme zadržavanja za PNSHH bilo je 3,3 minute, dok je za PNSO iznosilo 3,7 minuta.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U radu se pratila aktivnost HheC enzima provedbom testa aktivnosti s PNSO u reakciji otvaranja epoksidnog prstena s bromidnim ionima, u prisustvu organskih otapala, uz nastajanje PNSHH. Aktivnost enzima mjerila se pomoću HPLC analize koja se temelji na metodi početnih reakcijskih brzina, gdje se reakcijska smjesa uzorkuje 5 puta u kratkom vremenskom razdoblju, unutar 10 % konverzije PNSO. Koncentracije PNSO i PNSHH također su određene HPLC analizom, pomoću prethodno pripremljenih baždarnih pravaca koji su dobiveni obradom uzoraka na isti način. Specifične aktivnosti enzima, u ispitanim organskim otapalima, izračunate su iz linearne promjene koncentracije PNSHH tijekom vremena, kada je konverzija supstrata manja od 10 %.

4.1. Aktivnost HheC uz hidrofobna organska otapala

Ispitan je utjecaj osam različitih hidrofobnih organskih otapala na specifičnu aktivnost enzima u reakciji otvaranja PNSO prstena s bromidnim ionima: etil-acetat (EtOAc), metil-*tert*-butil eter (MTBE), diizopropil eter (DIPE), kloroform, toluen, cikloheksan, *n*-heksan i *n*-heptan (slika 8.). Koeficijent raspodjele ($\log P$) mjera je hidrofobnosti organskog otapala. Što je veća $\log P$ vrijednost, to je otapalo hidrofobnije [9]. Parametar c_{50} definiran je kao volumna koncentracija organskog otapala koja smanjuje aktivnost enzima za polovicu od ukupne vrijednosti u svakom testiranju. Parametar uključuje ukupni utjecaj organskog otapala na enzim tijekom pojedinačne analize aktivnosti enzima, uključujući inhibiciju otapalom, brzu deaktivaciju i ograničenja prijenosa mase [20]. Vrijednosti parametra c_{50} procjenjuju se iz grafa specifične aktivnosti enzima i volumnih udjela organskog otapala dobivenih metodom početnih reakcijskih brzina, prikazanim na slici 8 [36]. Dobivene vrijednosti $\log P$ i c_{50} prikazane su u tablici 3.

Tablica 3. Usporedba parametra c_{50} i koeficijenta raspodjele između oktanola i vode ($\log P$) za ispitana hidrofobna organska otapala za HheC u PNSO reakciji otvaranja prstena

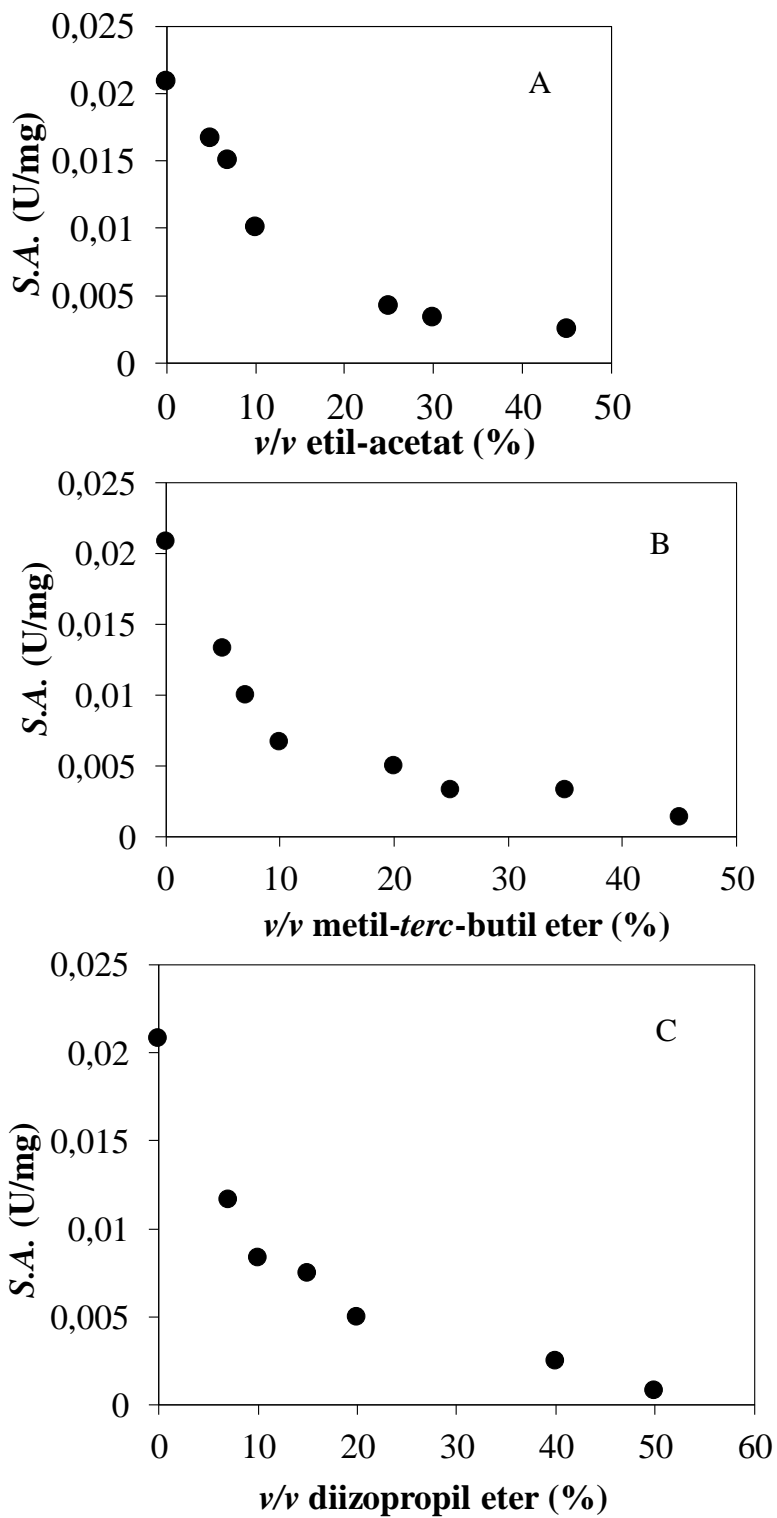
Otapalo	$\log P$	c_{50} / %
EtOAc	0,73	9,9
MTBE	0,94	7,4

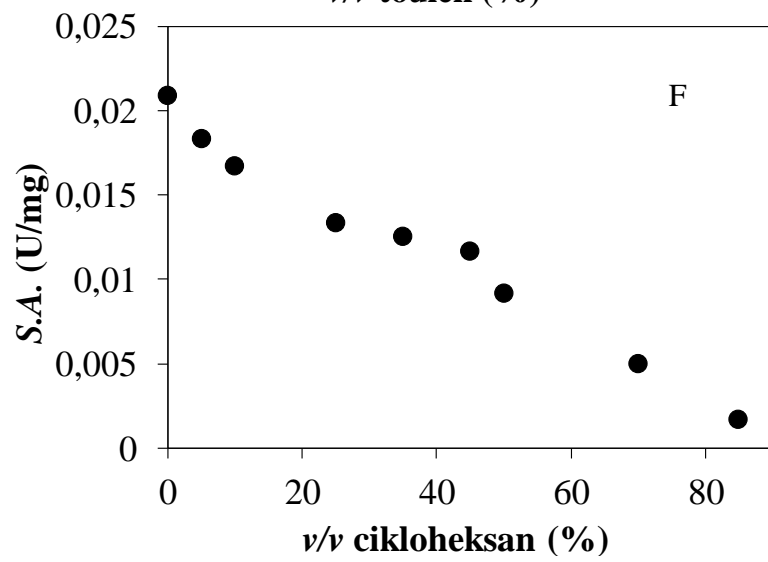
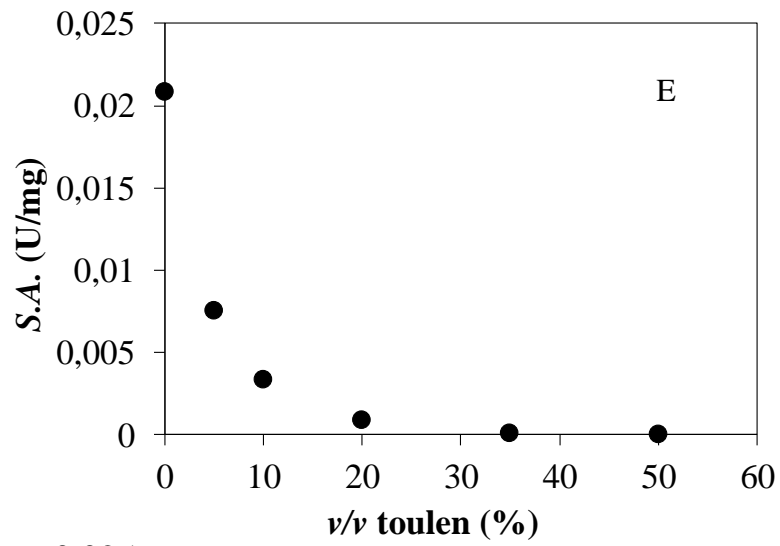
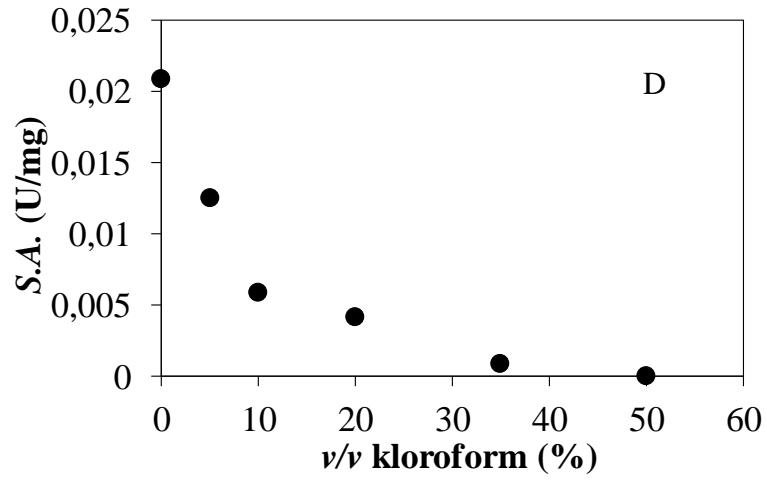
DIPE	1,52	8,2
kloroform	1,97	6,8
toulen	2,73	3,8
cikloheksan	3,44	51,9
<i>n</i> -heksan	3,9	51,3
<i>n</i> -heptan	4,66	47,3

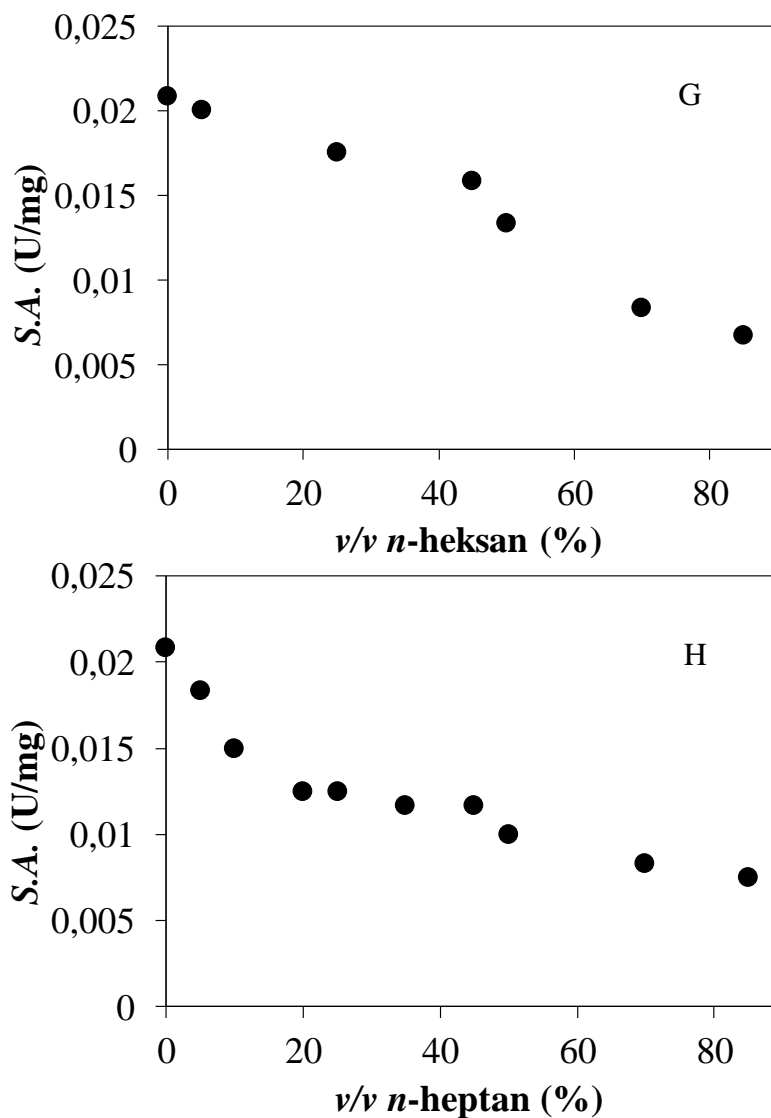
Iz rezultata možemo uvidjeti kako su sva ispitana otapala imala relativno velik negativan utjecaj na aktivnost enzima u reakciji otvaranja prstena. Hidrofobni alkani (cikloheksan, *n*-heksan, *n*-heptan) pokazali su manji negativan utjecaj na aktivnost enzima u usporedbi s drugim ispitanim organskim otapalima (EtOAc, DIPE, MTBE, kloroform, toluen). Najprikladnijim otapalom pokazao se cikloheksan s dobivenom c_{50} vrijednosti od 51,9 %.

Na slici 8 prikazan je utjecaj različitih volumnih udjela organskih otapala na specifičnu aktivnost HHDH u reakciji otvaranja prstena s bromidnim ionima. Kod etil-acetata, MTBE, DIPE i kloroforma ostvarena je niska aktivnost enzima pri volumnim udjelima od 10 % i 20 % (v/v), a daljnjim povećanjem aktivnost se smanjuje (slike 8.A – 8.D). Kod toulena (slika 8.E) enzimi zadržavaju nisku aktivnost pri udjelu od 10 % organskog otapala, dok već pri 20 % (v/v) aktivnost enzima naglo opada. Niska specifična aktivnost enzima u toulenu može se pripisati mogućem uključenju toulena u π - π interakcije s aromatskim aminokiselinama u aktivnom mjestu, ometajući tako ulazak supstrata i inhibirajući njegovo vezanje [36]. Halogeni spojevi su prirodni supstrati HHDH enzima, koji se pojavljuju u malim količinama tijekom katalize, prema tome velika je vjerojatnost da će poliklorirane molekule kloroforma pokazati snažno inhibicijsko djelovanje prema HheC u reakciji otvaranja prstena, osobito kada je prisutan u visokim koncentracijama [20,36]. Kod cikloheksana, *n*-heksana i *n*-heptana veća je zadržana aktivnost enzima i ostaje konstantna pri volumnim udjelima od 30 i 40 % (v/v). Poznato je da su interakcije između alkana i proteina isključivo hidrofobne, prema tome alkani mogu očuvati nativnu strukturu proteina i ponekad produžiti stabilnost enzima [20]. Osim toga, u prisustvu *n*-heptana, *n*-heksana ili cikloheksana (slike 8.F – 8.H) enzimi zadržavaju polovicu svoje aktivnosti čak i pri 80 % (v/v), što znači da sadržaj vode nije odlučujući faktor u ispitivanom rasponu koncentracija organskih

otapala. Najboljim otapalom za provedbu reakcije otvaranja PNSO prstena s bromidnim ionima kataliziranu HheC enzimima, pokazao se cikloheksan.







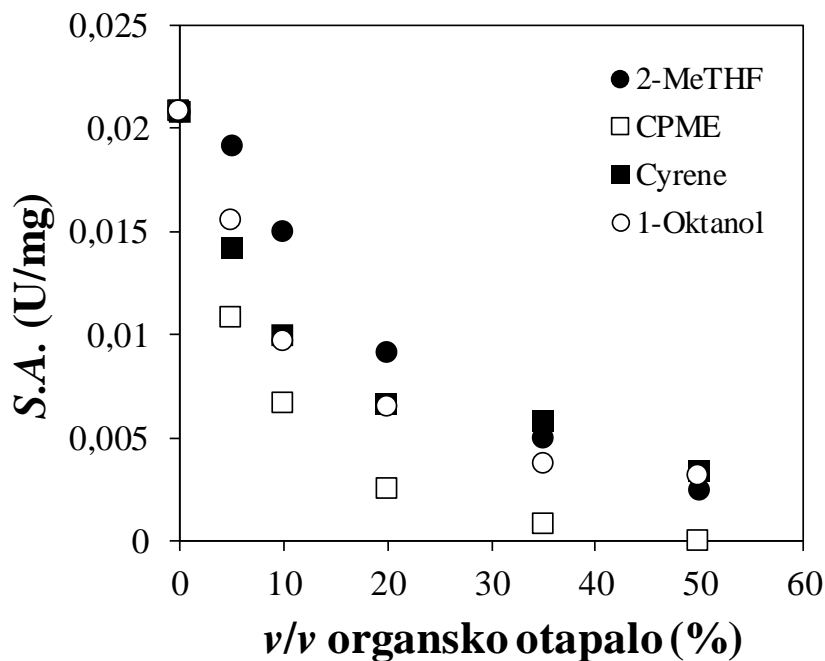
Slika 8. Specifična aktivnost enzima HheC u reakciji otvaranja PNSO prstena u prisutnosti različitih volumnih udjela organskih otapala: A. etil-acetat (EtOAc); B. metil-*terc*-butil eter (MTBE); C. DIPE; D. kloroform; E. toluen; F. cikloheksan; G. *n*-heksan; H. *n*-heptan

4.2. Aktivnost HheC uz „zelena“ organska otapala

U prethodnom poglavlju opisan je utjecaj hidrofobnih organskih otapala koja su često u upotrebi, međutim, njihovo dobivanje i odlaganje nije u skladu s ekološkim standardima. Opisana otapala su s ekološke perspektive neprihvatljiva zbog svoje ekološke toksičnosti i dobivanja iz naftnih derivata. Zbog toga su u sklopu ovog rada ispitana i alternativna „zelena“ organska otapala koja uključuju: etanol, koji se može dobiti fermentacijom, Cyrene dobiven pirolizom i hidrolizom celuloze, 2-metiltetrahidrofuran (2-MeTHF), ciklopentil-metil eter (CPME) dobiven dehidracijom šećera i 1-oktanol. U tablici 4 prikazane su vrijednosti logP i c_{50} za ispitana otapala. Sva ispitana otapala imaju relativno niske vrijednosti logP. Poznato je da svojstva enzima u dvofaznim sustavima s vodom ovise o hidrofilnosti/hidrofobnosti alternativnog otapala i obično su očuvana u većoj mjeri u prisutnosti hidrofobnih organskih otapala (opisano u poglavlju 2.2) [20]. Prema tome, za očekivati je da većina ovih alternativa neće biti prikladna. Ova pretpostavka je potvrđena PNSO testovima aktivnosti u reakciji otvaranja prstena (slika 9), gdje je dobiveno manje od 10 % specifične aktivnosti enzima pri 50 % volumnog udjela 2-MeTHF, CPME i Cyrene (tablica 4) [20].

Tablica 4. Usporedba parametra c_{50} i koeficijenta raspodjele između oktanela i vode (logP) za ispitana „zelena“ organska otapala

Otapalo	logP	c_{50} , %
Cyrene	-1,52	9,8
2-MeTHF	1,1	18,0
CPME	1,6	5,1
1-oktanol	3,5	9,7



Slika 9. Specifična aktivnost enzima HheC u reakciji otvaranja PNSO prstena u prisutnosti različitih volumnih udjela „zelenih” organskih otapala: 2-MeTHF; CPME; Cyrene; 1-oktanol

Test aktivnosti s 50 % (v/v) 1-oktanolom, hidrofobnim alifatskim alkoholom koji se može dobiti iz šećera, pokazao je da aktivnost nije zadržana, što ukazuje da hidrofobnost/hidrofilnost nije jedini čimbenik koji utječe na aktivnost enzima. Osim toga funkcionalne skupine otapala, vrsta reakcije, stabilnost biokatalizatora, topljivost ispitivanih spojeva i mogućnost oporavka enzima također imaju utjecaj na aktivnost enzima [20].

5. ZAKLJUČAK

Cilj ovog rada bio je ispitati svojstvo aktivnosti HheC enzima u prisustvu različitih organskih otapala u reakciji otvaranja PNSO prstena s bromidnim ionima. Organska otapala izabrana su kao medij zbog vrlo slabe topljivosti industrijskih supstrata u vodi i njihove sklonosti hidrolizi. Enzim je izoliran i pročišćen iz genetski modificiranih stanica bakterije *E. coli*, koja je uzgajana s prekomjernom ekspresijom ovog enzima. Aktivnost enzima određivana je PNSO-testom aktivnosti s različitim volumnim udjelima organskih otapala (1 – 50 % (v/v)). Analiza uzoraka provedena je na HPLC uređaju s detektorom s nizom fotometrijskih dioda pri 275 nm i 30 °C. Vremena zadržavanja za PNSHH i PNSO iznosila su 3,3 odnosno 3,7 minuta.

Provedenim istraživanjem utvrđeno je kako koeficijent raspodjele između oktanol i vode ($\log P$) utječe na aktivnost enzima, na način da se s povećanjem hidrofobnosti organskog otapala zadržava veća aktivnost enzima. Primjećujemo da hidrofobnost organskih otapala ovisi o funkcionalnim skupinama, odnosno esteri, eteri i areni su manje hidrofobni od alkana. Iz dobivenih rezultata $\log P$, hidrofobnost otapala raste redosljedom: EtOAc, MTBE, DIPE, kloroform, toulén, cikloheksan, *n*-heksan, *n*-heptan. Prema tome, najveća zadržana aktivnost enzima postignuta je u prisustvu *n*-heptana, *n*-heksana i cikloheksana pri volumnim udjelima od 30 i 40 % (v/v). Kod ostalih organskih otapala zabilježene su niske zadržane aktivnosti, čak i pri nižim volumnim udjelima otapala. Osim toga, najmanji inhibicijski učinak pokazuje cikloheksan koji pri volumnoj koncentraciji od 51,9 % zadržava polovicu od ukupne aktivnosti enzima. Međutim, s ekološkog stajališta, cikloheksan je toksično i opasno organsko otapalo, te ne predstavlja najbolji odabir.

Ispitana su četiri „zelena” organska otapala u kojima enzim nije zadržao više od 10 % specifične aktivnosti enzima pri 50 % volumnog udjela otapala. Jedno od ispitanih „zelenih” organskih otapala bio je i hidrofobni alkohol, 1-oktanol, koji također nije zadržao aktivnost enzima pri ispitanim udjelima. Ovi rezultati nalažu kako hidrofobnost otapala nije jedini faktor koji utječe na aktivnost enzima. Osim hidrofobnosti, poznato je da na aktivnost enzima utječu i funkcionalne skupine otapala, molekularna struktura otapala, vrsta reakcije, izvedba enzima, topljivost enzima, te ostale složene interakcije između enzima i otapala. Kako bi se bolje razumjelo djelovanje organskih otapala na aktivnost enzima, potrebno je provesti detaljnija eksperimentalna istraživanja uz primjenu računalnih metoda.

6. POPIS KRATICA I SIMBOLA

Kratice

AD1 – sekvenca HheC gena iz *Agrobacterium radiobacter*

AD2 – sekvenca HheA2 gena iz bakterije *Arthrobacter* sp.

AdhS – alkohol-dehidrogenaze

ACN – acetonitril

CPME – ciklopentil-metil eter

Cyrene™ – dihidrolevoglukozenon (engl. *Dihydrolevoglucosenone*)

DIPE – diizopropil eter

DMSO – dimetil sulfoksid

DMF – dimetil formamid

DMA – dimetil acetamid (engl. *Dimethylacetamide*)

EtOAc – etil-acetat

E.C. – enzimski komisijski broj (engl. *Enzyme Commission*)

ETBE – etil-*terc*-butil eter

EL – etil-laktat

EH – epoksidne hidrolaze

E. coli – *Escherichia coli*

GP1 – sekvenca HheB2 gena iz bakterije *Mycobacterium* sp.

GVL – γ -valerolakton (engl. *γ -Valerolactone*)

HheC – C-tip halogenhidrin-dehalogenaze

HHDH – halogenhidrin-dehalogenaze (engl. *Halohydrin dehalogenase*)

HheA – A-tip halogenhidrin-dehalogenaze

HheB – B-tip halogenhidrin-dehalogenaze

HheG – G-tip halogenhidrin-dehalogenaze

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*)

IRB – Institut „Ruđer Bošković“

kDa – kilodalton, unificirana atomska jedinica mase (Da ili u)

logP – koeficijent raspodjele između oktanela i vode

LC – tekućinska kromatografija (engl. *Liquid Chromatography*)

MTBE – metil-*terc*-butil eter

2-MeTHF – 2-metiltetrahidrofuran

N-1074 – sekvenca HheA i HheB gena iz bakterije *Corynebacterium* sp.

NHG3 – sekvenca HheC gena iz bakterije *Rhizobium* sp.

NMP – 1-metil-2-pirolidon (engl. *N-Methyl-2-pyrrolidone*)

NaBr – natrijev bromid

PNSO – *para*-nitrostiren oksid

pH – negativan logaritam aktiviteta vodikovih iona

PNSHH – *para*-nitro-2-brom-1-feniletanol

PDA – niz fotodioda (engl. *Photodiode array*)

SDR – kratkolančane dehidrogenaze/reduktaze (engl. *Short-chain dehydrogenase/reductase*)

Ser-Tyr-Arg – aminokiseline serin-tirozin-arginin (engl. *Serine-Tyrosine-Arginine*)

TAME – *terc*-amil-metil eter

Tris-SO₄ – 2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propandiol sulfatni pufer

TFA – trifluoroctena kiselina (engl. *Trifluoroacetic acid*)

Simboli

(v/v) – volumni udio tvari u otopini, %

$S.A.$ – specifična aktivnost, $U\ mg^{-1}$

V_R – volumen reaktora, mL

V_E – volumen dodanog enzima, mL

dc/dt – promjena koncentracije produkta tijekom vremena, /

γ_E – koncentracija enzima u osnovnoj otopini, $mg\ dm^{-3}$

c_{50} – volumna koncentracija organskog otapala koja smanjuje aktivnost enzima za polovicu od ukupne vrijednosti, %

7. LITERATURA

- [1] Bell E. L., Finnigan W., France S. P., Green A. P., Hayes M. A., Hepworth L. J., Lovelock S. L., Niikura H., Osuna S., Romero E., Ryan K. S., Turner N. J., Flitsch S. L., Biocatalysis, *Nat. Rev. Methods Prim. 1* (2021) **46**, 1-21.
- [2] Žnidaršič-Plazl P., Biocatalytic process intensification via efficient biocatalyst immobilization, miniaturization, and process integration, *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* **32** (2021) 100546.
- [3] Singh R., Kumar M., Mittal A., Mehta P. K., Microbial enzymes: industrial progress in 21st century, *3 Biotech* **6** (2016) 174.
- [4] N. Milčić, M. Sudar, I. Dokli, M. Majerić Elenkov, Z. Findrik Blažević, Halohydrin dehalogenase-catalysed synthesis of enantiopure fluorinated building blocks: bottlenecks found and explained by applying a reaction engineering approach, *React. Chem. Eng.* **8**, **673** (2023) 673-686.
- [5] Dokli I., Milčić N., Marin P., Svetec Miklenić M., Sudar M., Tang L., Findrik Blažević Z., Majerić Elenkov M., Halohydrin dehalogenase-catalysed synthesis of fluorinated aromatic chiral building blocks, *Catalysis Communications* **152** (2021) 106285.
- [6] Tomaszewska J., Koroniak K., Koroniak H., Fluorinated organic azides – their preparation and synthetic applications, *ARKIVOC* **2** (2017) 421-432.
- [7] Findrik Blažević Z., Milčić N., Sudar M., Majerić Elenkov M., Halohydrin Dehalogenases and Their Potential in Industrial Application – A Viewpoint of Enzyme Reaction Engineering, *Advanced Synthesis and Catalysis* **363** (2) (2020) 388-410.
- [8] Stepankova V., Nevolova S., Koudelakova T., Prokop Z., Chaloupkova R., Damborský J., Strategies for Stabilization of Enzymes in Organic Solvents, *ACS Catal.* **3** (2013) 2823-2836.
- [9] Wang S. Meng X., Zhou H., Liu Yang, Secundo F., Liu Yun, Enzyme Stability and Activity in Non-Aqueous Reaction Systems: A Mini Review, *Catalysts* **6** (2) (2016) 32.
- [10] Blamey J. M., Fischer F., Meyer H. P., Sarmiento F., Zinn M., Enzymatic Biocatalysis in Chemical Transformations: A Promising and Emerging Field in Green Chemistry Practice, u: Brahmachari G., *Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications*, New York, *Elsevier*, (2017) 347–403.

- [11] Findrik Blažević Z., Bioreakcijska tehnika I, Interna skripta, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, 2013.
- [12] <http://eskola.chem.pmf.hr/udzbenik/u43/17%20proteini.pdf> (pristup 26.05.2023)
- [13] <https://www.znanje.org/i/i2011/11iv06/11iv0607/3d%20struktura.htm> (pristup 26.05.2023.)
- [14] Kim H. S., Choi J. M., Han S. S., Industrial Applications of Enzyme Biocatalysis: Current Status and Future Aspects, *Biotechnol. Adv.*, **33** (7) (2015) 1443 – 1454.
- [15] Fernandez-Lucas J., New trends in industrial biocatalysis, *Biotechnology Advances* (2021).
- [16] María P., Gonzalo G., Alcántara A., Biocatalysis as Useful Tool in Asymmetric Synthesis: An Assessment of Recently Granted Patents (2014-2019), *Catalysts* **9** (2019) 802.
- [17] Schallmeyer A., Schallmeyer M., Recent advances on halohydrin dehalogenases— from enzyme identification to novel biocatalytic applications, *Appl Microbiol Biotechnol* **100** (2016) 7827–7839.
- [18] Van Hylckama Vlieg J., Tang L., Lutje Spelberg J. H., Smilda T., Poelarends G. J., Bosma T., van Merode A. E. J., Fraaije M., Janssen D. B., Halohydrin Dehalogenases Are Structurally and Mechanistically Related to Short-Chain Dehydrogenases/Reductases, *J. Bacteriol.* **183** (17) (2001) 5058-5066.
- [19] Schallmeyer M., Koopmeiners J., Wells E., Wardenga R., Schallmeyer A., Expanding the Halohydrin Dehalogenase Enzyme Family: Identification of Novel Enzymes by Database Mining, *Appl. Environ. Microbiol.* **80** (2014) 7303-7315.
- [20] Milčić N., Matematičko modeliranje i optimizacija biokatalitičke sinteze fluoriranih kiralnih građevnih blokova, Doktorski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, 2023.
- [21] Jiang Q., Fang R., Gul I., Aer L., Zhao Y., Guo J., Tang L., Halohydrin dehalogenase immobilization in magnetic biochar for sustainable halocarbon biodegradation and biotransformation, *Environ. Technol. Innov.* **27** (2022) 102759.
- [22] Cao C, Matsuda T, Biocatalysis in Organic Solvents, Supercritical Fluids and Ionic Liquids, in A. Goswami and J. D. Stewart (Eds.), Organic Synthesis Using Biocatalysis, Cambridge, Elsevier, 2016, p. 67-97.

- [23] Dirkmann M., Iglesias-Fernández J., Muñoz V., Sokkar P., Rumancev C., von Gundlach A., Krenczyk O., Vöpel T., Nowack J., Schroer M.A., Ebbinghaus S., Herrmann C., Rosenhahn A., Sanchez-Garcia E., Schulz F., A Multiperspective Approach to Solvent Regulation of Enzymatic Activity: HMG-CoA Reductase, *ChemBioChem*. **19** (2018) 153-158.
- [24] Sheldon R. A., Brady D., Broadening the Scope of Biocatalysis in Sustainable Organic Synthesis, *ChemSusChem*. **12** (2019) 2859-2881.
- [25] Tobiszewski M, Namieśnik J., Greener organic solvents in analytical chemistry, *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* (2017).
- [26] Sheldon R. A., Bode M. L., Mathebula N., Green and sustainable solvents for biocatalytic oxidations, *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* (2023) 1-8.
- [27] Sheldon R. A., The Greening of Solvents: Towards Sustainable Organic Synthesis, *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* (2018) 1-15.
- [28] Hashmi S. F., Merio-Talvio H., Ruuttunen K., Sixta H., Influence of reaction conditions on solvolysis of organosolv lignin using water and green organic co-solvents as reaction medium, *Fuel Processing Technology* **197** (2020) 1-12.
- [29] Sarmah D., Kanta Borah K., Bora U., Aqueous extracts of biomass ash as an alternative class of Green Solvents for organic transformations: A review update, *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, Volume **24**, (2021).
- [30] Mikleušević A., Primožič I., Hrenar T., Salopek-Sondi B., Tang L., Majerić Elenkov M., Azidolysis of epoxides catalysed by the halohydrin dehalogenase from *Arthrobacter* sp. AD2 and a mutant with enhanced enantioselectivity: an (S)-selective HHDH, *Tetrahedron. Asymmetry*. **27** (2016) 930-935.
- [31] Van Schie M. M. C. H., Spöring J.-D., Bocola M., Domínguez de María P., Rother D., Applied biocatalysis beyond just buffers – from aqueous to unconventional media. Options and guidelines, *Green Chem*. **23** (2021) 3191-3206.
- [32] Tunçer S., Gurbanov R., Sheraj I., Solel E., Esenturk O., Banerjee S., Low dose dimethyl sulfoxide driven gross molecular changes have the potential to interfere with various cellular processes, *Sci. Rep.* **8** (2018) 14828.

- [33] Jin H.-X., Liu Z.-Q., Hu Z.-C., Zheng Y.-G., Production of (R)-epichlorohydrin from 1,3-dichloro-2-propanol by two-step biocatalysis using haloalcohol dehalogenase and epoxide hydrolase in two-phase system, *Biochem. Eng. J.* **74** (2013) 1-7.
- [34] Zou S.-P., Zheng Y.-G., Du E.-H., Hu Z.-C., Enhancement of (S)-2,3-dichloro-1-propanol production by recombinant whole-cell biocatalyst in n-heptane-aqueous biphasic system., *J. Biotechnol.* **188** (2014) 42-47.
- [35] Dong F., Chen H., Malapit C.A., Prater M.B., Li M., Yuan M., Lim K., Minter S.D., Biphasic Bioelectrocatalytic Synthesis of Chiral β -Hydroxy Nitriles, *J. Am. Chem. Soc.* **142** (2020) 8374-8382.
- [36] N. Milčić, P. Švaco, M. Sudar, L. Tang, Z. Findrik Blažević, M. Majerić Elenkov, Impact of organic solvents on the catalytic performance of halohydrin dehalogenase, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2023)
- [37] <https://microbenotes.com/high-performance-liquid-chromatography-hplc/> (pristup 21.07.2023)
- [38] <https://www.knauer.net/en/Systems-Solutions/Analytical-HPLC-UHPLC/HPLC-Basics---principles-and-parameters> (pristup 21.07.2023.)
- [39] <https://www.pharmaguideline.com/2018/04/differences-between-hplc-and-uplc.html> (pristup 21.07.2023.)

8. PRILOZI

Prilog 1. Kromatogram **A** i baždarni pravci za HPLC analizu **B**: PNSHH i **C**: PNSO na Kinetex Phenomenex Core-shell C18 koloni

